

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592611

研究課題名（和文） マウス歯矯正モデルを用いたメカニカルストレスによる
骨リモデリング機序に関する研究

研究課題名（英文） Study of bone remodeling using mouse teeth movement model

研究代表者

深井 直実（FUKAI NAOMI）

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：60134681

研究成果の概要（和文）：骨のリモデリング（再構築）の機序を解明するため、マウス上顎の器官培養下に大白歯に力を加えることによって生じる分子生物学的な変化で観察した。歯牙が移動する以前にメカニカルストレスを加えた数時間後から I 型コラーゲンやエストロゲン受容体の RNA 発現に変化が見られた。このことからメカニカルストレスが早期から生体の遺伝子発現を変化させ、骨の再構築に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of bone remodeling was studied using organ culture system in which mechanical force was given to a molar of mouse maxilla. Before an actual tooth movement was observed expression of coll and estrogen receptor RNAs were changed just after a couple of hours after the stress was given. These results indicated that early molecular changes occurred and affected the bone remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学、骨リモデリング、マウス、器官培養

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの骨量は20歳前後で最高となり、加齢と共に減少してゆく。骨量の減少が過剰に進むと骨粗鬆症という病的状態となるが、閉経に伴い骨量減少の度合いの大きな女性では、その危険性はさらに増大する。我が国に於いて今後さらに高齢化が進むと、骨粗鬆症に係わる医療費の負担はより大きくなる事が予想され、その治療あるいは予防は社会的にも非常に重要である。

2009年に国際骨粗鬆症財団(IOF)は「アジア

の骨粗鬆症の疫学・医療費・負担2009」をまとめたが、これによると今までアジア人では欧米人に比べ骨粗鬆症が少ないと考えられていたが、調査では脊椎骨骨折がアジア人でも一般化していることが明らかになった。また股関節部骨折数はアジア各国で増加し、日本でも75歳以上の高齢者でこの12年に急増していることが報告されている。

骨粗鬆症の治療あるいは予防は、日本だけでなく、アジアそして世界的にも非常に重要な課題である。

(2) 運動すなわちメカニカルストレスを骨に加えることが、骨量の増加を促進する一要素であることはよく知られている。カルシウム摂取だけでなく、適度な運動で骨に負荷をかけることが骨粗鬆症の予防治療に必要である。

一方、病気によりベッドに寝たきりとなったりまた骨折でのギブス固定で身体の不動化状態が長期間にわたり骨への負荷が減少すると骨量が減少する。また宇宙空間で無重力状態にさらされると筋肉量の減少と共に骨量が減少する。宇宙空間での微小重力環境下での急激な骨密度の減少は、宇宙放射線の問題とともに宇宙医学に於ける大きな課題である。

(3) 歯科の矯正治療は、加えられた外力（メカニカルストレス）によって歯の移動が生じることによって成り立っている。すなわち矯正歯根部の圧迫側にある歯槽骨では骨吸収が、牽引側にある歯槽骨では骨添加が起こり、歯槽骨内で歯の移動が起こっている。そして個体差はあるもののこの歯槽骨のリモデリング、すなわち歯の移動が数週間から数か月といったきわめて短時間に起きている。

(4) 骨は骨芽細胞による骨産生と破骨細胞による骨吸収が並行して起こりたえず作りかえられていて、これを骨の改築、リモデリングという。歯の矯正はメカニカルストレスによって起きる骨のリモデリング機構の研究にとって、特に短期間でその変化を観察できるという観点からもきわめて有用なモデルと考えられる。

(5) 今日まで犬等大型動物を用いた歯矯正の研究は多々あるが、小型動物なかでもマウスを用いた実験は少ない。マウス全ゲノムは既に解読されており、また種々の遺伝子改変マウスも利用できることから、マウスで歯の矯正の実験系ができれば、メカニカルストレスによって生じる骨リモデリング機構の遺伝子レベルでの解明に寄与できるものと思われる。

(6) そこでメカニカルストレスによる骨のリモデリングのモデルをマウスの歯を用いた矯正モデルで作れないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 歯矯正モデルの実験系をマウスにて作成する。

(2) このモデルを用い、マウス歯にメカニカ

ルストレスを加えることによって生じる歯槽骨での骨リモデリングの機構を解明する。

(3) 骨の形成異常、特に低形成を改善する方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 生きたマウスを用い、その第一大臼歯にコイルスプリングによって負荷をかけて起こる変化を観察し、過去の知見と比較する。

(2) マウスの上顎の器官培養下で、その第一大臼歯に前方向に引くメカニカルストレスを加える系を作成する。用具を考案開発するとともに、培養条件の確立、培養器官の歯に加えるメカニカルストレスの大きさをコントロールする方法も検討する。

(3) 上記によって生じる歯槽骨での変化を形態学的に観察する。すなわち変化の組織学的検査および免疫組織学的検査である。

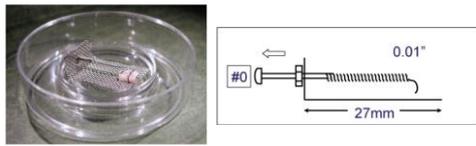
(4) (1)によって生じた変化を視腫骨にある細胞の RNA 発現レベルで注目した遺伝子発現を観察する。

4. 研究成果

(1) 当初、生きたマウスを用い、歯にメカニカルストレスを加える事を過去の文献例にならって試みた。ヒト矯正用の最小のコイルスプリング(RMO Elgiloy F-50)を、上顎の切歯と第一大臼歯間にかけてそれぞれの歯を牽引した。歯槽骨内での歯根の移動は組織学的に確認したが、定常的結果を得ることまた長期間砂和1-2週間以上の結果を得ることは不可能であった。理由は設置するスプリングが2-3mm長で、加える力をコントロールすることが不可能なこと、さらにマウスにとってはたとえ小さな物であっても口腔内のコイルスプリングは大きな異物で、常設することは大きな負担で、餌の摂取を著しく妨げ全身状態を長期に安定させることは不可能であったためである。

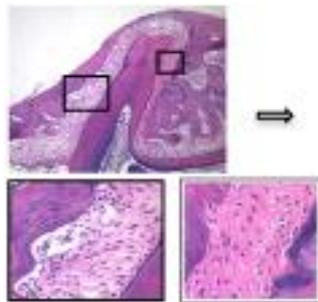
(2) そこでマウスの上顎全体を摘出し、器官培養下にメカニカルストレスを加える装置を考案開発した。次頁の図のごとくのものである。器官培養用のディッシュ(Falcon3037)の中央部にはまるメッシュ上に摘出したマウス上顎を固定し、その第一大臼歯にフックをかけコイルスプリングにて前方方向への力をかけるものである。マウス大臼歯の咬頭は鋭で上顎では後方に傾斜しており、中央窩に

スプリングの端を錘状にしたものを引っ掛け引くことができる。スプリングの引く力はナットの回転数によって調節できる。使用ネジのピッチを知ることによりボルトの回転数から移動距離を算出することもできる。



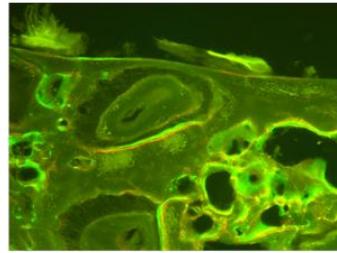
Organ culture dish and a device giving mechanical force to a mouse molar

(3) 上記装置によって、メカニカルストレスを歯に与えることができ、歯根の位置が歯槽内で移動していることを確認した。下図は上顎第一大臼歯の遠心頰側根の垂直方向の断面で前方すなわち図の右方向へ力を加えた3日目のH&E染色組織像である。下段左は牽引側で歯根膜のシャープイ線維が伸展されており、下段右の圧迫側では線維がたわんでいるのがわかる。



H&E staining of three days culture of the 1st molar. The periodontal ligaments are stretched or compressed on each side according to the force.

(4) 摘出した上顎は6x6x1mmほどの大きさで5%CO₂ インキュベータで、通常の2倍の抗生物質添加の培養液にて培養した。歯根膜線維芽細胞の形態から5日ほどの培養は可能であった。しかしこの5日ではキレート剤による骨表面のマーキングにて歯槽骨のリモデリングは確認できなかった。下図は事前に骨表面をカルセインで染色したマウスにて行った臼歯部の水平断である。歯根の位置で解るように図の右方向に力を加えているが、圧迫側のキレート剤は残っており吸収は起こっていないことを示している。逆に左側の牽引側で染色が消失しているのは生理的な歯牙の移動による。

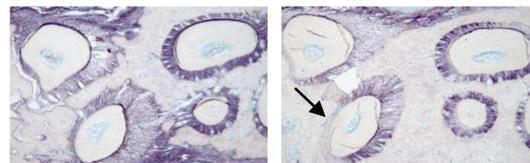


5 days culture after marking the bone surface chelating reagents. No absorption of the alveolar bone is noted on the compressed side.

(5) しかし、メカニカルストレスを加えた際に生じる変化、特に遺伝子発現レベルで変化は、実際に歯が移動する前から、それも力を加えたかなり早期から生じているはずであるという仮説のもと、培養早期でのRNAレベルの変化を *in situ hybridization* にて調べた。これによりメカニカルストレスを加えたごく早期から、具体的にはI型コラーゲンは圧迫側では力をかけた2時間以内から発現が減少しているが、牽引側では発現が維持されているのがわかった。しかしこの圧迫側の変化はメカニカルストレスを加えた30分後では確認できなかった。

下図左の牽引30分後の *in situ hybridization* では歯根膜全周でのI型コラーゲンの発現が維持されているが、右の2時間後では左下矢印で示すように圧迫側の歯根膜での発現が減少しているのが解る。

I型コラーゲンは歯根膜で最も多量に含まれるコラーゲンで歯槽骨と歯根とを架橋している。したがってこの発現の増減は歯根膜中にある細胞に影響を及ぼすことが予想される。

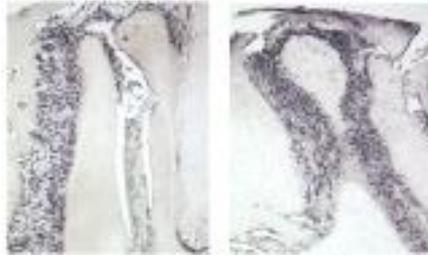


coll *in situ hybridization*, 30 minutes (Left) and 2 hours (Right) after giving mechanical force.

Decreased expression of the coll is noted in the compressed side but not in expanded side at 2 hours.

同様にエストロゲン受容体(ER α)のRNA発現レベルもチェックした。これもI型コラーゲンと同様の傾向を示し、圧迫側で早期からその発現が減少していた。下図左がメカニカルストレスを加えたもので、右がコントロールである。エストロゲン受容体 α は女性ホルモンの主要な受容体であり、この発現がメカニカルストレスによって変動することは

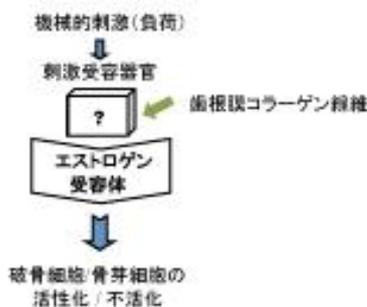
閉経後の女性で骨量の減少が急激に生じることを考えるときわめて興味深い。



Estrigen receptor alpha expression in the periodontal ligament. Left:after 3 hours traction. Right:control

なお牽引側と圧迫側の遺伝子の発現の相違を網羅的に調べるため、それぞれの部域から細胞を集めRNAを調整しその発現プロファイルを作成することを計画していたが、材料が小さく十分量のサンプルを得ることができず調べられなかった。

(6) 以上から、骨にメカニカルストレスを加えた場合、数時間後から遺伝子発現レベルの変化が生じていることがわかった。I型コラーゲンは歯根膜線維の主たるコラーゲンである。牽引側で発現が維持されることは、歯を支えようとする歯根膜の存在意義と合致し、また圧迫側での発現の減少が早期から認められることは生体のメカニカルストレスに対する合目的な結果であると考えられる。エストロゲン受容体の発現がメカニカルストレスを加えた早期から変動していたことは、閉経期の女性に骨粗鬆症発生の頻度が増すことを考えると興味深い知見だと考えられる。



機械的な刺激(負荷)によって骨のリモデリングすなわち破骨細胞あるいは骨芽細胞の活性化/不活性化がおこなわれるのであるが、その機序はいまだ不明である。しかし今回の知見から歯に加えたメカニカルストレスが歯根膜細胞(線維芽細胞)に働きかけ、そのタンパク発現、特にI型コラーゲンとエストロゲン受容体のRNAの発現に時間単位というごく早期から影響を与えることがわかった。

最後にやはり2011年3月の震災の影響で最後の年度はほとんど計画を進展させることができなかつた。とても残念であり、悔いも残る。しかし上記のような結果からこの研究自体の意義そして発展性は十分にあると考え、今後も骨とメカニカルストレスの関係を追求してゆきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

- ① 深井直実、マウスの歯を動かして解る事、バイオイメージング特別セミナー、2011、香川
- ② 深井直実、マウスの歯を動かしてわかること、第34回歯の会形態学シンポジウム、2010、新潟

[その他]

ホームページ等

<http://www.ohu-u.ac.jp/faculty/research/researchD2.html>

<http://shingakunet.com/net/sensei/detail/SC000179/900027619>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深井 直実 (FUKAI NAOMI)
奥羽大学・歯学部・教授
研究者番号：60134681

(2) 研究分担者

茂呂 祐利子 (MORO YURIKO)
奥羽大学・歯学部・助教
研究者番号：90433549

(3) 連携研究者

大和 雅之 (YAMATO MASAYUKI)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：40711726